

学校编码: 10384

密级_____

学号: 22620081151546

廈門大學

硕士学位论文

一株海洋噬菌体与一株分离于病毒浓缩液
的海洋细菌的分离与鉴定

Isolation and Identification of a *Paracoccus* sp. phage and a
marine bacteria isolated from viral concentrates

徐永乐

指导教师姓名: 焦念志 教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2013 年 9 月

论文答辩时间: 2011 年 9 月

2011 年 9 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 徐永乐

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：徐永乐

年 月 日

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	III
第一章 综述	1
1.1 海洋浮游病毒学的研究概况	1
1.2 海洋浮游病毒的基本特征及其主要类群	2
1.3 病毒的生活周期	3
1.4 海洋浮游病毒的基本生态特征	5
1.4.1 海洋浮游病毒在海洋生物地球化学过程中的作用	5
1.4.2 病毒对水平基因转移的影响	7
1.4.3 病毒对宿主多样性及群落结构的影响	7
1.4.4 病毒编码的宿主基因	8
1.5 海洋浮游病毒生态学的基本研究方法	10
1.5.1 病毒丰度的计数方法	10
1.5.2 病毒生产力和宿主死亡率的估算方法	12
1.5.3 海洋浮游病毒多样性的研究方法	13
1.5.4 海洋浮游病毒的分离	15
第二章 一株海洋副球菌噬菌体 PMJL ϕ 1 的分离鉴定及全基因序列分析	17
2.1 材料与方法	18
2.1.1 宿主菌株的培养和噬菌体的分离	18
2.1.2 噬菌体电镜观测	19
2.1.3 噬菌体宿主范围检测	19
2.1.4 噬菌体一步生长曲线	19
2.1.5 氯仿敏感性检测	20
2.1.6 噬菌体浓缩纯化	20
2.1.7 噬菌体基因组 DNA 的提取	21

2.1.8 噬菌体基因组 DNA 纯度测试及测序	22
2.1.9 噬菌体基因组序列的生物信息学分析	22
2.2 结果与讨论	23
2.2.1 病毒分离使用的菌株及分离结果	23
2.2.2 噬菌斑特征及噬菌体形态	24
2.2.3 PMJL ϕ 1 <i>Paracoccus</i> 属内宿主范围检测	25
2.2.4 一步生长曲线	26
2.2.5 氯仿敏感性检测	27
2.2.6 基因组 DNA 纯度检测	27
2.2.7 全基因组序列分析	27
第三章 一株分离于病毒浓缩液的海军细菌的鉴定	37
3.1 材料与方法	38
3.1.1 菌株来源	38
3.1.2 培养基	38
3.1.3 鉴定方法	38
3.1.4 菌体细胞脂肪酸测定	42
3.1.5 细胞极性脂测定	43
3.1.6 抗生素敏感性实验	44
3.1.7 菌体基因组 DNA G+C% 测定	44
3.1.8 进化树构建	45
3.2 结果与讨论	45
3.2.1 待鉴定菌株序列测定结果	45
3.2.2 菌落形态与菌体形态	46
3.2.3 碳源利用	47
3.2.4 产酸实验	47
3.2.5 各项生理生化指标及与参照菌株的对比分析	48
3.2.6 抗生素敏感性实验	51
3.2.7 脂肪酸含量分析	52
3.2.8 极性脂测定结果	53
3.2.9 对比分析总结	54

3.3 JLT2000 的整体描述	55
主要结论及创新点	56
参考文献	58
致 谢	68

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract (in Chinese)	I
Abstract (in English)	III
Chapter 1 Preface	1
1.1 History of marine viroplankton ecology	1
1.2 General property of Virus and main groups of Marine viroplankton	2
1.3 The virus life cycle	2
1.4 General ecological properties of marine viroplankton	5
1.4.1 Roles of marine viroplankton in marine biogeochemical process	5
1.4.2 Virus impact on horizontal gene transfer	7
1.4.3 Virus impact on host diversity and community structure	7
1.4.4 Virus-encoded host genes	8
1.5 Methods for marine viroplankton ecology	10
1.5.1 Methods for virus enumeration	10
1.5.2 Methods for estimating viral production and host motality	12
1.5.3 Methods for viral diversity estimation	13
1.5.4 Marine virus isolation	15
Chapter 2 Isolation and whole genome sequence of one marine	
<i>Paracoccus</i> phage PMJLϕ1	17
2.1 Materials and methods	18
2.1.1 Host strains and phage isolation	18
2.1.2 Transmission electron microscopy (TEM) observation	19
2.1.3 Cross infection	19
2.1.4 One-step curve	19
2.1.5 Choloform sensitivity	20
2.1.6 Phage concentration and purification	20
2.1.7 Phage genome DNA extraction	21
2.1.8 Phage genome DNA purity test and squencing	22
2.1.9 Genome sequence bioinformatical analysis	22
2.2 Results and discussion	23

2.2.1 Bacteria strains used in phage isolation and result	23
2.2.2 Plaque features and phage morphology	24
2.2.3 Host range of PMJLφ1 in genus <i>Paracoccus</i>	25
2.2.4 One-step curve	26
2.2.5 Chloroform sensity test result	27
2.2.6 Genome DNA purity test	27
2.2.7 Whole genome sequence analysis	27
Chapter 3 Identification of one marine bacteria strain isolated from viral concentrates	37
3.1 Methods and materials	38
3.1.1 Bacteria isolation site	38
3.1.2 Medium	38
3.1.3 Identification methods	38
3.1.4 Whole cell lipids assay	42
3.1.5 Polar lipid assay	43
3.1.6 Antibiotic sentivity test	44
3.1.7 G+C content analysis of the genome DNA	44
3.1.8 Phylogenetic tree construction	45
3.2 Results and discussion	45
3.2.1 16S rRNA sequence analysis	45
3.2.2 Colony features and cell morpology	46
3.2.3 Carbon source utilization	47
3.2.4 Acid production test	47
3.2.5 Physiology and biochemical analysis	48
3.2.6 Antibiotic sensitivity test	51
3.2.7 Whole cell Lipid acid content analysis result	52
3.2.8 Polar lipid assay result	53
3.2.9 Summary of the comparation	54
3.3 Discription of JLT2000	55
Conclusion and originality	56
References	58
Acknowledgements	68

摘要

海洋浮游病毒是海洋生态系统中丰度最高,多样性极为丰富,生物量仅次于原核生物的有机体。由于对宿主的侵染和裂解作用,海洋浮游病毒影响和调节着微生物的群落结构和生物地球化学特征以及海洋生态系统中的物质和能量的流动。

为从个体水平上了解海洋浮游病毒及其与宿主的相互作用,本研究一方面从海洋噬菌体的分离入手,在中国东海海域分离得到一株侵染海洋副球菌的噬菌体 PMJL ϕ 1,并在此基础上,从生理与基因水平上对该病毒进行了研究和描述;另一方面,在取于同一站位的在 4 °C 中存放一年之久的海洋病毒浓缩液分离得到一株海洋细菌 JLT2000。由于其独特的分离得到途径,研究其长久的耐寒及抗病毒机制有很大的意义。另外,由于其与已鉴定菌株较低的相似性,我们首先对其作了细菌学鉴定。本文的研究结果如下:

(1) 在中国东海海域分离得到的噬菌体 PMJL ϕ 1 从形态上看属于长尾噬菌体,有一个直径约 50 nm 的等轴的头部,长约 122 nm,宽约 10 nm 的可弯曲,不可收缩的尾部。侵染宿主 JL65 的潜伏期及裂解量分别约为 30 min 和 27。对氯仿的敏感度具有浓度依赖性。此外,PMJL ϕ 1 为双链 DNA 病毒,基因组为环状,总长度为 42,093 bp, G+C 含量为 56.37%。在该病毒基因组中预测得到 53 个 ORF,其中大约 55%的基因是未知的。有推测功能的基因包括 DNA 复制相关的基因,编码结构蛋白相关的基因及其它参与到 DNA 代谢,氨基酸代谢,转录调节等过程的基因。另外值得注意的是在病毒的基因组中存在 4 个与 GTA 类似的基因。PMJL ϕ 1 的 53 个 ORF 中有 22 个与一株分离于假单胞菌的噬菌体 PA73 有最高及较高的相似性,8 个 ORF 与本实验室一株分离鉴定并全基因组测序的海洋细菌 *Citromicrobium* sp. JLT1363 有着最高及较高的相似性。

(2) JLT2000 为一株革兰氏阴性菌,严格好氧,化能异养,氧化酶,接触酶阳性。菌体形态为拟杆状,具有运动性,可以在 6-9 的 pH 值范围内,4-40 °C 的温度范围内,0-12%的盐度范围内生长。它可以利用 D-半乳糖,甘露醇,海藻糖,二水 D-葡萄糖酸钠,丙酮酸钠, α -乳糖,纤维二糖,山梨醇,肌醇,L-谷氨酸钠,葡萄糖

等单碳源; 并且可以利用甘露醇, 葡萄糖, 蔗糖, 乳糖, 纤维二糖, 海藻糖, 肌醇, D-半乳糖等糖醇类产酸. 可以水解七叶苷, 淀粉, 几丁质, 酪素, 不能水解琼脂, 纤维素, 明胶, 尿素, DNA. 脂肪酸的主要组分有 iso-C_{15:0}, iso-C_{15:0} 3-OH, iso-C_{17:0} 3-OH, Sum In Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w6c). 极性脂成分较为单一, 包括一种磷脂酰甘油(PG), 和两种心磷脂(DPG1, DPG2). JLT2000 对四环素, 氯霉素, 红霉素, 麦迪霉素, 万古霉素, 氧氟沙星, 环丙沙星, 克拉霉素, 克林霉素敏感. JLT2000 与 *Marivirga sericea* LMG 13021^T 有最高的相似性, 为 96.1%, 与 *Marivirga tractuosa* KCTC 2958^T 的 16S 相似性为 95.77%.

关键词: 海洋浮游病毒; 噬菌体; 基因组学分析; 细菌鉴定

Abstract

Marine virioplankton is one of the most abundant and diverse biological entities in marine environment. It has the largest abundance and second largest biomass in the marine ecosystem. Because of the infection and lysis on host, virus could affect and regulate the microbial community structure and biogeochemistry properties, as well as the fluxes of carbon and nutrients in marine ecosystem.

In order to characterize the interaction between virus and its host, this study was based on the isolation of marine phage. A phage named PMJL ϕ 1 which could infect a marine *Paracoccus* sp. was isolated from the East China Sea. The phage was characterized and described in the physiology and gene level. In addition, one bacteria strain named JLT2000 was isolated and characterized from the viral concentrates which had been preserved in 4 °C for one year from the same station, because of its unique cold-resistant, virus-resistant features and low 16S rRNA gene similarity with other identified bacteria. The results are presented as follows:

(1) PMJL ϕ 1 isolated from the ECS has a siphovirus morphology. It has an isometric head (ca. 50 nm in diameter) and a long, flexible, noncontractile tail (ca. 122 nm long and ca. 10 nm wide). The latent period and burst size are 30 min and 27, respectively. Sensitivity to chloroform is density-dependant. In addition, the genome DNA is circular with a length of 42,093 bp, and a G+C content of 56.37%. 53 putative open reading frames (ORFs) were identified from the genome. Almost 55% of the genes have unknown functions. Others having putative functions include genes related to DNA replication, metabolism, structure formation, amino acid metabolism, transcriptional regulatory and four GTA-like genes. Of the 53 genes, 22 showed high sequence homology to genes identified from *Pseudomonas* phage PA73, and 8 genes to one marine bacteria strain *Citromicrobium* sp. JLT1363, which was also isolated and characterized in our lab.

(2) JLT2000 is gram-staining-negative, strictly aerobic, chemoorganotroph, cytochrome oxidase-, catalase-positive, rod-shaped cells, and motile by gliding. On RO agar, colonies are irregular, dark orange, shiny and 2-4 mm in diameter after 48 h of incubation. Growth was observed at 4-40 °C and in the presence of 0-12% NaCl, with optimal growth at 25 °C and 6-8% NaCl. This strain could utilize D-galactose,

Mannitol, Trehalose, D-sodium gluconate, Sodium Pyruvate, α -lactose, Cellobiose, Sorbitol, inositol, glucose. It could also produce acid from mannose, sucrose, L-arabinose, lactose, D-galactose, L-fucose, inositol. Nitrate was not reduced. H₂S was produced but Indole and acetoin (Voges-Proskauer reaction) were not. Aescine, casein, starch and chitin were hydrolysed. Agar, urea, cellulose and gelation were not hydrolysed. The main cellular fatty acids of JLT2000 are iso-C_{15:0}, iso-C_{15:0} 3-OH, iso-C_{17:0} 3-OH, Sum In Feature 3 (16:1 w7c/16:1 w6c). The polar lipids contain one kind of PG and two kinds of DPGs. JLT2000 is sensitive to Tetracycline, Chloramphenicol, Erythromycin, Medemycin, Vancomycin, Ofloxacin, Ciprofloxacin, Clarithromycin, Clindamycin. JLT2000 has a highest similarity with *Marivirga sericea* LMG 13021^T, 96.1% in 16S rRNA gene sequence, and 95.77% with *Marivirga tractuosa* KCTC 2958^T.

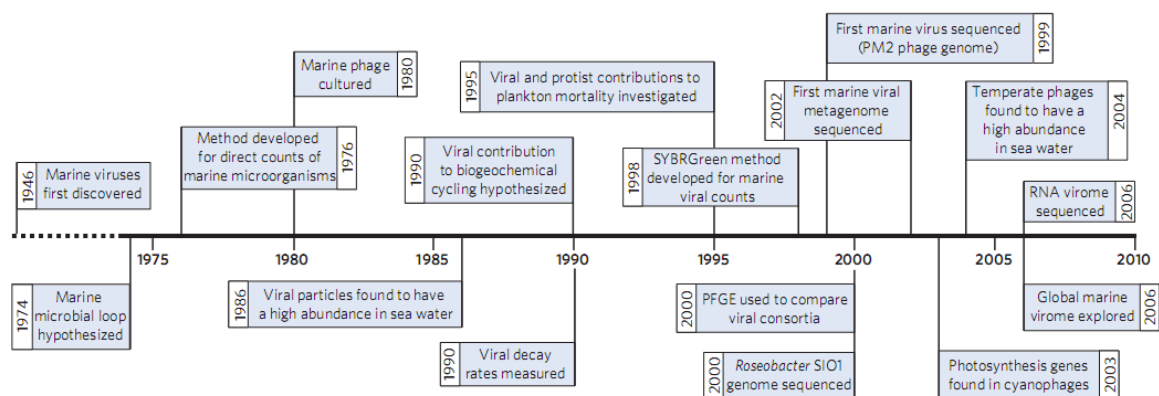
Key words: Marine viroplankton; phage; genome analysis; bacteria identification

第一章 综述

海洋浮游病毒是目前海洋中发现的丰度最高的生物实体。在深海病毒的丰度可以达到 $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ，在生产力高的近岸环境，其丰度可以达到 10^8 mL^{-1} 。假定地球上海洋的总体积为 $1.3 \times 10^{21} \text{ L}$ ，病毒的平均丰度为 $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的话，那么海洋中病毒的总数量可达 10^{30} ^[1]。即使病毒体积小，但其高丰度使其成为海洋中生物量仅次于原核生物的第二大生物实体。由于对宿主的裂解作用，海洋浮游病毒被认为是海洋生态系统中生物地球化学循环的催化剂。据估计，海洋生态系统中大约每天 20% 的死亡率是由病毒引起的^[1]，同样，由于侵染特定的宿主，病毒对微生物的群落多样性及结构也产生着重要的影响。除此之外，海洋浮游病毒多样性非常丰富，是地球上最大的未知基因库之一。病毒几乎无处不在，所以其在海洋生态系统中的作用无疑是非常显著的。而海洋浮游病毒生态学的研究一直是近年来海洋微生物生态学研究的前沿热点。

1.1 海洋浮游病毒学的研究概况

海洋噬菌体最早发现于上个世纪 50 年代初^[2, 3]，它的存在直到 70 年代微生物环的提出才得到解释。1979 年 Francisco Torrella 和 Richard Morita 发现海洋中的类病毒粒子具有非常高的丰度(10^4 mL^{-1})，而且从形态上看类似于噬菌体^[4]。不久后使用海洋细菌从海水中分离得到病毒纯株^[5]。在 90 年代，海洋噬菌体及真核病毒的多样性以及它们在海洋浮游生物群落生态中的重要性被逐渐了解到。由此，海洋浮游病毒逐渐成为海洋生态学研究的前沿热点。许多基于病毒对浮游生物的裂解作用研究，阐释了病毒和原生动物对生物地球化学循环的贡献^[6-9, 11]。在研究病毒对宿主生理学与生态学的影响的同时，随着第一株病毒的全基因组测序，基因组学，宏基因组学也逐渐被应用于海水中 RNA^[12, 13]和 DNA^[14, 15]病毒的多样性的研究中^[16]。

图 1-1 海洋病毒学的研究概况^[16]Fig. 1-1 High lights in marine virology research^[16]

1.2 海洋浮游病毒的基本特征及其主要类群

通常情况下, 病毒以细胞内细胞外两种形式存在. 在细胞外, 病毒以蛋白衣壳包裹核酸的病毒粒子(viron)的形式存在, 在此期间, 病毒处于休眠状态, 不进行呼吸与生物合成作用. 在宿主细胞内, 病毒开始进行复制作用, 合成基因组 DNA 和衣壳蛋白, 并组装新的病毒粒子. 由于病毒没有独立, 完整的酶系统, 所以其复制在很大程度上依赖于宿主. 在其进入细胞内后, 会控制宿主的代谢来支持其自身的复制和组装, 直到释放出来, 开始新一轮的循环.

不同的病毒粒子有不同的形态和大小. 大小一般在 20 到 300 nm 之间. 基因组大小也从几 k 到几百 k 不等. 其中, 侵染芽胞杆菌 *Bacillus megatrium* 的一个病毒的基因组有 670 kb. 而有些病毒基因组小到只能编码 5 个基因^[17].

病毒按其核酸类型可以分为双链 DNA (dsDNA)病毒, 单链 DNA (ssDNA)病毒和双链 RNA (dsRNA)病毒, 单链 RNA (ssRNA)病毒. 一般来讲, 病毒的基因组包含一类核酸物质, 或是 DNA 或是 RNA, 但有些病毒会在其生活周期的不同的阶段, 同时包含 DNA 和 RNA 作为基因组物质. 大部分病毒的基因组是线状的, 有些病毒是环状的.

病毒还可以根据其宿主进行分类, 海洋中的浮游病毒主要包括细菌病毒即噬菌体(bacteriophage), 蓝细菌病毒(cyanophage), 真核藻类病毒(phycovirus)等, 其中蓝细菌病毒在分类学上属于噬菌体. 由于海洋中原核生物丰度最高, 所以海洋中的病毒绝大部分为噬菌体^[18]. 目前, 海洋中已分离的噬菌体以有尾噬菌体最为

常见。根据有尾噬菌体的形态特征又可以分为三个科：肌尾噬菌体科(Myoviridae)，短尾噬菌体科(Podoviridae)和长尾噬菌体科(Siphoviridae)。它们都是双链 DNA 病毒。肌尾噬菌体通常有一个可收缩的尾部，是海水中最容易分离到的噬菌体种类之一，一般为裂解性病毒，有着较广的宿主范围，以 T4 噬菌体为代表。短尾噬菌体有着较短，不可收缩的尾部，宿主范围较窄，具有侵染的专一性与强裂解性，以 T7 噬菌体为代表。长尾病毒一般有一个较长的可弯曲，不可收缩的尾部，也是海洋中较为容易分离到的病毒。另外在长尾噬菌体里面有一部分可以整合到宿主基因组上成为前噬菌体(prophage)，所以一部分为温和性，一部分为裂解性，以 λ 噬菌体为代表^[1]。

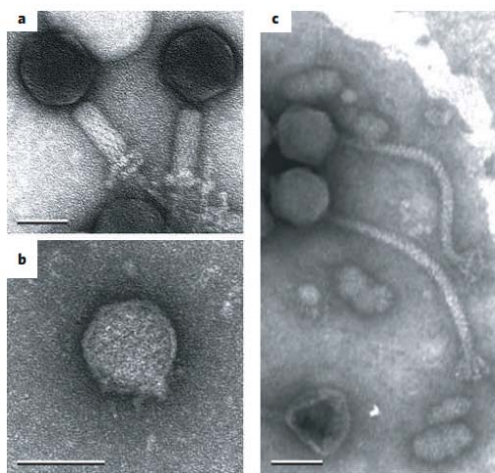


图 1-2 海洋噬菌体透射电镜图: a, 肌尾病毒; b, 短尾病毒; c, 长尾病毒^[1]

Fig. 1-2 TEM image of marine phage: a, Myovirus; b, Podovirus; c, Siphovirus^[1]

1.3 病毒的生活周期

原核生物的病毒的一个完整的生活周期可以划分为以下几个步骤^[19]:

- (1) 吸附: 这个过程又可以分为两步, 首先, 病毒吸附到宿主细胞表面, 这个过程是可逆的, 即存在病毒脱落下来的可能性; 再次, 病毒结构(如尾丝)与细胞受体发生不可逆转性结合。
- (2) 核酸和衣壳分离与注射: 在吸附完成后, 宿主细胞壁在一些酶的作用下可穿透性增加, 由此病毒核酸进入宿主细胞内, 而衣壳留在细胞外。

(3) 核酸的表达和复制: 核酸进入宿主细胞后, 不同的核酸进入不同的生活周期, 或者连接到宿主基因组上, 或者保留在宿主细胞质中. 保留在细胞质中的核酸有可能会进入下一步的基因表达, 基因组 DNA 复制, 衣壳及其他结构蛋白的合成.

(4) 病毒颗粒的组装: 在材料准备完成后, 即进入衣壳的装配和基因组的包装, 形成完整的病毒颗粒.

(5) 病毒颗粒的释放和传播: 成熟的病毒颗粒或通过裂解细胞释放到环境中去, 或通过出芽与外排的方式释放出去.

由病毒感染宿主的方式的不同, 病毒的生活循环周期类型可表现为以下几种:

(1) 裂解性感染(lytic): 裂解性病毒在核酸进入宿主细胞内后, 直接进入核酸的表达和复制阶段, 控制宿主的代谢系统, 使之为自身复制服务, 当病毒颗粒组装完成后就会裂解细胞, 释放到环境中去.

(2) 溶源性感染(lysogenic): 溶源性或温和性病毒在核酸进入宿主细胞后, 并不进入裂解性循环, 而是把基因组整合到宿主基因组上, 使之成为宿主基因组的一部分, 并随宿主的基因组复制而复制, 称之为前噬菌体(prophage). 当环境中存在诱导因素(物理, 化学)的时候, 前噬菌体基因组 DNA 会从宿主基因组上脱落下来, 从而进入裂解性循环周期. 溶源性感染被认为是在宿主丰度较低的情况下, 病毒的一种生活策略.

(3) 慢性感染(chronic): 病毒侵染宿主细胞后, 会不断的通过出芽或外排的方式释放少量的子代病毒, 而不会裂解宿主细胞. 这类感染对宿主是非致死性的.

(4) 伪溶源性感染(pseudolysogenic): 病毒核酸进入宿主细胞后暂时处于休眠状态, 以类似质粒的方式存在于细胞质中, 不会立即表达复制. 当存在诱因时, 也会进入裂解性循环周期. 这类感染的机制可能是宿主受体的减少或受体酶活性的丧失, 或者是温和性病毒的存在而引起的免疫作用.

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库